

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01372

大肠杆菌 *glgC* 基因的定点突变及功能分析

周爽, 许可, 何明雄, 张义正

四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川省分子生物学与生物技术重点实验室, 成都 610065

摘要: 利用 PCR 从 *Escherichia coli* JM109 基因组中扩增到全长为 1 296 bp 的 *glgC* 基因编码区, 通过 PCR 重组方法进行点突变, 获得氨基酸突变的 3 个突变体, 分别是 Pro295Ser(Val121Ala, Met151Ile 和 Val334Asp)、Gly336Asp 单点突变和 Pro295Ser/Gly336Asp(Lys109Arg), 其基因分别命名为 295⁺³、336 和 295/336⁺¹。将突变和未突变的基因分别克隆到 pET32-a, 构建重组质粒 pET-*glgC*、pET-295⁺³、pET-336 和 pET-295/336⁺¹, 在文中分别简称为 a、b、c 和 d。转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 1 mmol/L IPTG 诱导下表达。SDS-PAGE 电泳分析显示, 在约 67 kDa 处有 1 条明显与预期大小一致的蛋白质, 表明目的基因已得到融合表达。上述转化子的碘染和糖原含量测定结果, 第 336 位的 Gly 变成 Asp 后, 宿主菌的糖原含量提高; Pro295Ser/Gly336Asp(Lys109Arg) 的突变导致宿主菌的糖原含量与 Gly336Asp 突变体相近, 表明在 336 突变基因的基础上增加 Pro295Ser 的突变没有进一步加大宿主菌中 AGPase 酶的反馈抑制效应的降低。已有的结果显示, Pro295Ser 可以降低 AGPase 酶的反馈抑制效应活性, 而实验中 295⁺³ 突变基因转入宿主菌后细胞糖原含量明显降低, 推测这个结果可能是 295⁺³ 中的 Val334Asp 的突变造成, 而 334 位的氨基酸可能是 AGPase 功能域中的一个重要位点。

关键词: *glgC* 基因; 定点突变; 重组 PCR; 原核表达; 功能分析

Site-directed mutagenesis and function analysis of *glgC* gene from *Escherichia coli*

ZHOU Shuang, XU Ke, HE Ming-Xiong, ZHANG Yi-Zheng

Key Laboratory of Resource Biology & Eco-environment, Ministry of Education, Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: Using genomic DNA of *Escherichia coli* JM109 as a template, *glgC* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The full coding sequence of this gene is 1296 bp. To get 3 mutants that amino acids changed: P295S (V121A, M151I, V334D), G336D and P295S/G336D (K109R) by recombinant PCR, respectively named 295⁺³, 336 and 295/336⁺¹. The 3 mutants and the original *glgC* were subcloned into the prokaryotic expression vector pET-32a, and these recombinant expression plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for effective expression. The host cells were induced with IPTG and then identified by SDS-PAGE. A specific fused-expression product 67 kDa was detected, which was the same as the deduced protein. In the host cells above, the biological activities of the expressed products were detected by iodine vapor staining and glycogen content testing. The host cell transformed with the mutated gene—336 had higher glycogen content, which was identical to the gene—295/336⁺¹. This confirmed that Pro295Ser could not reinforce the decrease

收稿日期: 2008-03-23; 修回日期: 2008-05-19

基金项目: 四川省“十一五”重点攻关项目(编号: 07SG111-003-1)资助[Supported by “Eleventh-Five” Key Project of Sichuan Province (No. 07SG111-003-1)]

作者简介: 周爽(1983-), 女, 湖北人, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学及基因工程。Tel: 13459190212; E-mail: mxxhappygirl@163.com。

通讯作者: 张义正(1947-), 男, 重庆人, 教授, 研究方向: 分子遗传学及基因工程。Tel: 028-85412738; E-mail: yizhang@scu.edu.cn。

of the feedback inhibition effect of the AGPase. Meanwhile, another host cell transformed with the mutated gene—295⁺³ showed decreased glycogen rather than the expected increasing glycogen. This might be caused by another mutation, Val334Asp in gene—295⁺³, which might induce the change of the allosteric region of the objective protein.

Keywords: *glgC*; site-directed mutagenesis; recombinant pcr; prokaryotic expression; functional analysis

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)是微生物合成糖原和植物合成淀粉过程中的一个限速酶,催化 $\text{ATP} + \text{Glc-1-p} \rightleftharpoons \text{ADP-Glc} + \text{PPi}$, 产物 ADP-Glc 是葡萄糖残基的活性形式,为细菌糖原和植物淀粉的生物合成提供葡萄糖基^[1,2]。植物中的 AGPase 大多是由 2 个 51 kDa 的大亚基和 2 个 50 kDa 的小亚基组成的异源四聚体;其中,小亚基行使 AGPase 的催化功能,大亚基则调控小亚基的活性^[3,4]。为了得到改良的淀粉,研究者期望对 AGPase 进行改造,结果发现,大亚基由多基因家族编码,而小亚基虽然是单基因编码,但是有多种亚型;而且在植物体内,当两亚基协同作用时酶活最高,这对转基因植株的获得提高了难度^[5]。所以对植物 AGPase 大小亚基进行转基因的成功事例较少,即使成功效果也不明显。

大肠杆菌 AGPase 是由 4 个单体组成的同源四聚体,由一个单基因编码,该基因被命名为 *glgC*,且全序列已被测定^[6]。1969 年, Cattaneo 等^[7]发现 *Escherichia coli* K12 中的 1 个高糖原突变体,其糖原含量比野生型约高 30%,原因是 *glgC* 基因发生的突变导致第 336 位的氨基酸发生变化,从而改变 AGPase 的反馈抑制调节特性,并将该突变基因命名为 *glgC16*。Stark 等^[8]用 *E.coli* K12 的突变基因 *glgC16* 分别转化烟草和马铃薯,发现培养基中的烟草和马铃薯细胞的淀粉含量分别提高了 300%和 60%。进一步研究表明,原核生物的 *glgC* 基因转入真核生物中,由于前者编码的 AGPase 与后者编码的 AGPase 的反馈抑制调节特性不相同,原核 AGPase 在真核生物中能表现出更高的酶活性,因而才会有前面的转基因成功的结果。在小麦、玉米、木薯等的转基因研究中均证明了这样的结论,而且表明大肠杆菌 *glgC* 基因转入植物中一般都会引起植物中 AGPase 活性的提高,从而增加淀粉含量;而使自身 AGPase 酶活力提高的 *glgC* 突变基因转入植物中,则可以更大幅度的提高淀粉含量^[9~11]。1998 年, Christopher^[12]等在已有实验结果基础上进行

glgC 关键位点对酶活影响的研究,其中提到第 295 位氨基酸是 AGPase 酶的一个与反馈抑制效应相关的位点,而且进一步证实了 P295S 可以提高该酶对激活物的亲和力,然而 P295S 和 G336D 同时突变的实验还没有报道,因此,我们设计了 P295S 的突变体以及 P295S、G336D 位同时突变的突变体。实验中通过 PCR 重组技术分别得到了氨基酸在 P295S(同时有 V121A、M151I、V334D)和第 336 位氨基酸单突变以及第 295/336 位(同时有 K109R)突变基因,通过测序验证了突变效果,经过原核表达和功能检测证明突变效果,为开展木薯、马铃薯、甘薯等淀粉作物的高淀粉遗传改良工作奠定基础^[12~14]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体

Escherichia coli JM109 (F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15/recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1Δ(lac-proAB) mcrA), *E. coli* BL21(DE3) (F-, ompT, hsdSB (rB-mB-), gal (λ c I 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1)和 dcm) 及原核表达载体 pET-32a 均由本室保存,克隆载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 工具酶、试剂

Ex-Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司,限制性内切酶均购自陶宛 Fermentas 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA-BIO-TEX。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。其余试剂为进口或国产分析纯。

1.1.3 培养基

用于活性检测的培养基称为 Kornberg 加富固体培养基: 1.1% K_2HPO_4 , 0.85% KH_2PO_4 , 0.6% 酵母液, 1% 葡萄糖, 1.5% 琼脂;进行糖原含量测定时的培养基称为 M9 基础培养基: 4 mmol/L NaCl, 9 mmol/L NH_4Cl , 0.1 mmol/L CaCl_2 , 2 mmol/L MgSO_4 , 48

mmol/L Na_2HPO_4 和 22 mmol/L KH_2PO_4 [15]。以上培养基使用前均要高压灭菌, 并加入正确浓度的抗生素。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

参照 GenBank 登录号为 AP009048.1 的基因序列设计一对引物 P1 / P2, 用于扩增全长 *glgC* 基因。P295S 突变体, 简称“295”, 需将 883 位核苷酸由 C 突变成 T(即 CCG-TCG); G336D 突变体, 简称“336”, 需将 1 007 位核苷酸由 G 突变成 A(GGC-GAC); 第 295 和 336 位氨基酸均发生突变的基因简称“295/336”, 该基因的 883 和 1007 位核苷酸同时发生以上突变, 为此设计 2 对突变引物 P3 / P4 和 P5 / P6。引物序列如下:

P1: 5'-GCGATATCACCATGGTTAGTTTAGAG-AAGAACGA-3';

P2: 5'-CCGCTCGAGGTCGACTTATCGCTCC-TGTTTATG-3';

P3: 5'-CTGTGGTGTGCGAACTGGATATGTA-C-3';

P4: 5'-TACATATCCAGTTCCGACACCACAG-AG-3';

P5: 5'-ACTCACTAGTTTCCGACGGTTGTGT-G-3';

P6: 5'-GAGATCACACAACCGTCGGAACT-AG-3'。

1.2.2 *glgC* 基因的克隆

参照文献[16, 17]中的方法从 *E. coli* JM109 中

提取基因组 DNA, 作为扩增基因的模板, 以 P1、P2 为引物, 在 25 μL 体系中进行 PCR 扩增, 反应体系参照 Ex-Taq DNA 聚合酶使用说明书。PCR 仪的程序设置参见表 1。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 切出约 1.3 kb 的条带进行胶回收, 并与克隆载体 pMD18-T 进行连接反应, 方法参照说明书进行。连接产物转化 *E. coli* JM109, 通过筛选和鉴定获得阳性克隆, 并将质粒送交 Invitrogen 公司测序, 得到了重组质粒 pMD-*glgC*。

1.2.3 PCR 重组构建突变体

参考《PCR 技术实验指南》进行 PCR 重组构建突变基因 [18]。第 1 步是以质粒 pMD-*glgC* 作为模板, 扩增得到含有突变位点的 4 条小片段; 第 2 步是通过含有重复区域的 2 条配对的小片段进行退火, 延伸得到突变体的全长序列即大片段; 第 3 步是以大片段稀释 50 倍后的 1 μL 作为模板, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增, 得到特异的全长突变体基因 295、336 和 295/336。操作方案、PCR 程序设置参见表 1。通过胶回收, 连接, 转化, 重组质粒的筛选与鉴定, 将阳性克隆送交 Invitrogen 公司测序, 得到突变体的重组质粒 pMD-295⁺、pMD-336 和 pMD-295/336⁺, 通过测序结果分析定点突变的效果。

1.2.4 原核表达质粒的构建

以 *Nco* 和 *Xho* 双酶切重组质粒(pMD-*glgC*、pMD-295、pMD-336、pMD-295/336)及表达载体 pET-32a 的混合物, 方法参考 Fermentas 公司的限制

表 1 突变基因构建-PCR 重组方案

Table 1 Construction of mutated genes-PCR recombination

第一步: PCR 扩增小片段 Step 1: getting short fragments by PCR amplification				第二步: 重组 PCR 获得大片段 Step 2: getting long fragments by recombinant pcr		
小片段 Short fragments	基因位置 Gene position	引物 Primers	PCR 程序 PCR program	大片段 Long fragments	模板和引物 Template and primers	PCR 程序 PCR program
<i>glg295</i> -F	1~900	P1/ P4	94 , 3min 30	<i>glg295</i>	<i>glg295</i> -F, <i>glg295</i> -R	94 , 3min 10
<i>glg295</i> -R	873~1296	P3/ P2	cycles: 94 , 45 s ;			cycles: 94 , 45 s ;
<i>glg336</i> -F	1~1022	P1/ P6	58 , 45 s ; 72 , 5 s	<i>glg336</i>	<i>glg336</i> -F, <i>glg336</i> -R	58 , 45 s ; 72 , 90 s
<i>glg336</i> -R	992~1296	P5/ P2	72 , 10 min			72 , 10 min
				<i>glg295/336</i>	<i>glg336</i> -F, <i>glg295</i> -R	

注: *glg295*-F、*glg295*-R: *glg295* 第 295 位氨基酸之前、之后的编码序列; *glg336*-F、*glg336*-R: *glg336* 第 336 位氨基酸之前、之后的编码序列; *glg295*: 第 295 位氨基酸由 Pro 突变成 Ser 的 *glgC* 基因; *glg336*: 第 336 位氨基酸由 Gly 突变成 Asp 的 *glgC* 基因; *glg295/336*: 第 295 和 336 位氨基酸分别由 Pro 和 Gly 突变成 Ser 和 Asp 的 *glgC* 基因。

Notes: *glg295*-F, *glg295*-R: coding sequence before, behind the 295th amino acid of gene—*glgC*; *glg336*-F, *glg336*-R: coding sequence before, behind the 336th amino acid of gene—*glgC*; *glg295*: the mutated *glgC*—Pro295Ser; *glg336*: the mutated *glgC*—Gly336Asp; *glg295/336*: the mutated *glgC*—Pro295Ser/Gly336Asp.

酶使用说明书。其中尽量使目的基因与 pET-32a 的分子比达到 3 : 1 左右, 37 °C 反应 3 ~ 4 h, 将 EP 管置 65 °C 金属浴上 20 min, 然后加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的醋酸钾溶液沉淀, 离心后以 75% 乙醇清洗 2 次, 待乙醇挥发完全后, 溶于 20 μ L 无菌 ddH₂O, 取 10 μ L 酶切产物, 加入 1.5 μ L 10 \times T4 DNA 连接缓冲液、0.3 μ L 350 U/ μ L T4 DNA 连接酶、3.2 μ L 无菌 ddH₂O, 充分混匀后于 16 °C 连接过夜。转化 JM109, 经筛选和鉴定得到正确的转化子, 分别命名为 pET-*glgC*(WT)、pET-295、pET-336、pET-295/336。

1.2.5 重组基因的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳分析

将质粒 pET-*glgC*、pET-295、pET-336、pET-295/336、pET-32a(负对照)转入大肠杆菌 BL21(DE3), 对所得的转化子提取质粒 DNA, 通过 PCR 和双酶切鉴定后用于原核表达。表达条件为: 50 mL LB(含 50 μ g/mL 氨苄青霉素)培养基, 以 1 : 100 的比例接种过夜培养物, 220 r/min, 37 °C 振荡培养至 $OD_{600}=0.5$, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 37 °C 诱导 3 h, 取 1 mL 菌液 13000 r/min 离心 2 min, 用 500 μ L pH 7.5 的 PBS 缓冲液重悬细胞, 取 100 μ L 作为总蛋白进行 SDS-PAGE, 剩余部分用冰浴超声波破碎, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析, 其中分离胶为 10%, 浓缩胶为 2%。

1.2.6 表达产物的生物学活性分析

(1) 平板碘染法^[15]: 在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 Kornberg 固体培养基上划线接种过夜培养物, 37 °C 恒温培养 24 h, 用 3 mL 碘液(0.01 mol/L I₂, 0.03 mol/L KI)覆盖平板, 可以轻微晃动使碘液覆盖均匀和充分, 2 ~ 3 min 后将碘液倒掉, 观察和保存染色结果。

(2) EP 管碘染法^[22]: 先测定 24 h 后的菌液的 OD_{600} 分光光度值, 同时离心收集 1.5 mL 在液体 Kornberg 培养基中生长 24 h 的细胞, 除去上清, 以约 500 μ L ddH₂O 重悬, 通过 OD_{600} 分光光度值的比例来调整重悬后的体积, 使每个 EP 管的菌体浓度一致。然后向 EP 管中加入 200 μ L 碘液, 混匀反应 1~2 min, 观察和保存染色结果。

1.2.7 细菌的糖原测定

50 mL(含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素)的 M9 培养基, 以 1 : 50 的比例接种过夜培养的细胞 BL21(DE3), 其中的质粒分别是: pET-32a, pET-*glgC*,

pET-2951, pET-336, pET-295/336。220 r/min, 37 °C 振荡培养, 24 h 内间隔不同时间取 6~7 次样来测定, 每次取样 5 mL, 常温离心收集菌体, 重悬于 3 mL H₂O 中, 取出 1 mL 进行超声波破碎, 以 Bradford 法测定总蛋白含量^[19], 另 2 mL 以葡萄糖氧化酶过氧化物酶法来测定糖原含量^[20, 21]。将 2 mL 细胞悬液离心除去上清, 再以 pH 4.5 的柠檬酸钠缓冲液 2 mL 进行重悬, 置 100 °C 沸水中煮 15 min, 向其中加入 2 mL 2% 的糖化酶溶液(2 g 糖化酶准确溶于 100 mL pH 4.5 的柠檬酸缓冲液中, 其中糖化酶的规格为 100 000 U/g), 在 55 °C 温水浴中孵育 1 h 后, 取出 1 mL 测定葡萄糖含量^[20, 21]。计算方法: 葡萄糖的值为 Y nmol, 用 Bradford 法测得蛋白质含量为 X mg, 由于测蛋白质含量的细胞是测糖原细胞用量的一半, 因而细胞中糖原含量的准确表示方法是: $0.5 \times Y/X$ (nmol/mg 蛋白质)。

2 结果与分析

2.1 *glgC* 基因的克隆

PCR 产物经电泳检测(图 1), 结果表明: 扩增 *glgC* 基因的最佳复性温度为 58~60 °C。用 *Sac*I 和 *Xho*I 进行双酶切, 得到与 PCR 扩增时大小一致的目的 DNA 带(图 2), 表明得到了正确的重组子 pMD-*glgC*。测序结果表明: *glgC* 基因全长 1296 bp。利用生物学软件 DNAMAN 与已公布的该基因序列进行比对, 发现核苷酸同源性高达 99.85 %、氨基酸同源性为 99.77%。有 2 个核苷酸不同, 其中 371 位由 G 变成 A, 未引起氨基酸变化, 975 位由 T 变成 C, 导致 124 位的 Asn 变成 Ser, 但极性未发生变化。据报道, 该氨基酸的改变对 AGPase 的活性没有影响^[23]。

2.2 突变基因的构建和鉴定

测序结果(表 2)表明: *glgC* 295 基因的核苷酸变化

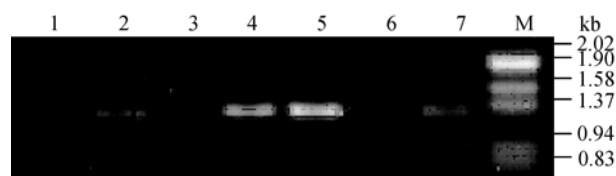


图 1 *glgC* 基因的 PCR 扩增

M: λ /Hind -EcoRI 分子量标准; 1~7: 分别为 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 °C 作为复性温度进行 PCR 扩增得到的 *glgC* 基因。

Fig. 1 PCR amplification of *glgC* gene

M: λ /Hind -EcoRI markers; 1~7: *glgC* cloned by PCR at 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 °C, respectively.

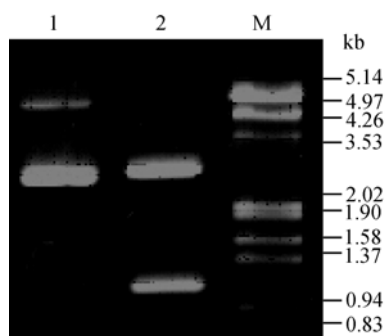


图 2 pMD-glgC 质粒的电泳及酶切鉴定

M: λ /Hind-EcoRI 分子量标准; 1: pMD-glgC 质粒; 2: Nco / Xho 双酶切质粒。

Fig. 2 Electrophoresis and enzyme digestion of pMD-glgC plasmid

M: λ /Hind-EcoRI markers; 1: Recombinant plasmid pMD-glgC; 2: digestion by Nco and Xho .

表 2 定点突变基因的测序结果

Table 2 Sequence of site-directed mutant genes

核苷酸位点 Nucleotide site	突变序列 Mutated sequences				氨基酸种类及等电点 Type and isoelectric point of amino acid	氨基酸位点 Location of amino acid
	glgC	295 ⁺³	336	295/336 ⁺¹		
326	A			G	Lys-Arg; 9.74 ~ 10.76	109
362	T	C			Val-Ala; 5.96 ~ 6.00	121
456	G	A			Met-Ile; 5.74 ~ 5.98	151
883	C	T		T	Pro-Ser; 6.30 ~ 5.68	295
1001	T	A			Val-Asp; 5.96 ~ 2.77	334
1007	G		A	A	Gly-Asp; 5.97 ~ 2.77	336

注: 295⁺³: 第 295 位氨基酸发生突变的 glgC 基因; 336: 第 336 位氨基酸发生突变的 glgC 基因; 295/336⁺¹: 第 295 位和 336 位氨基酸同时突变的 glgC 基因; glgC: 未突变的 glgC 基因。

Notes: 295⁺³: The glgC mutated at the point 295th amino acid; 336: The glgC mutated at the point 336th amino acid; 295/336⁺¹: The glgC mutated both at the point 295th and 336th amino acid; glgC: The unmutated glgC.

2.3 突变基因的原核表达及 SDS-PAGE 电泳分析

凝胶电泳结果表明, 得到 4 个相应的转化子: pET-glgC(WT), pET-295⁺³, pET-336, pET-295/336⁺¹。经双酶切得到了目的 DNA 片段, 约为 1.3 kb。SDS-PAGE 电泳结果(图 3)表明: 在适当诱导条件下, 4 个重组质粒在 BL21(DE3)中表达出约 67 kDa 的蛋白。除去载体 N-端的蛋白质标签, 目的蛋白约 54 kDa, 这与已报道的 GlgC 蛋白分子量相符, 而负对照空载体及未诱导的重组质粒均无目的产物。由此可见, 4 个 glgC 基因都得到了较高水平的表达。通过分别对超声破碎后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 发现目的蛋白主要以包涵体形式存在。

2.4 表达产物的生物学活性分析

平板碘染法可以直观有效的反映宿主菌中糖原的含量, 图 4 中 1、3 和 4 被染成蓝色, 表明糖原含

为 T362C、G456A、C883T、T1001A, 引起的氨基酸变化为 V121A、M151I、P295S、V334D。其中 295 位突变是预期的, 而另 3 个是意外突变, 121、151 位的突变未造成氨基酸极性变化。据报道, 第 121、151 位的氨基酸并不影响 AGPase 活性^[23], 而第 334 位的氨基酸由中性 Val 变成酸性 Asp, 可能会导致 AGPase 活性变化。glg336 基因的核苷酸变化为 G1007A, 氨基酸变化为 G336D, 是预期的定点突变。glg295/336 基因的核苷酸变化为 A326G、C883T、G1007A, 氨基酸变化为 K109R、P295S、G336D, 其中 109 位突变是意外突变, 该突变未引起氨基酸极性变化。由此可见突变效果: glg336 最佳, 其次是 glg295/336, glg295 最差, 将 glg295、glg295/336 基因分别命名为 glg295⁺³、glg295/336⁺¹, 上标的数字表示意外突变的个数。

量较高; 而 2 和 5 被染成黄色, 说明糖原含量低。由此可以得出结论: 野生型 glgC 基因、glg336 和 glg295/336⁺¹ 表达出的蛋白质均能表现出生物学活性; 而 glg295⁺³ 和 NC 的产物则表现出很低的糖原合成能力。

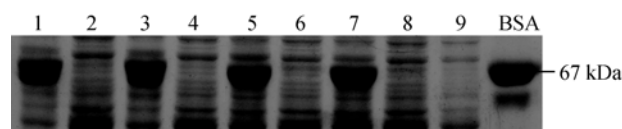


图 3 突变基因诱导表达的 SDS-PAGE 电泳分析

1、3、5、7、9: IPTG 诱导; 2、4、6、8: 未诱导; 1: pET-glgC; 2: pET-295⁺³; 3: pET-336; 4: pET-295/336⁺¹; 5: pET-32a; 6: BSA; 7: 67 kDa 的牛血清白蛋白作为对照。

Fig. 3 Analysis of electrophoresis for expressions induced by mutated genes

1, 3, 5, 7, 9: Induced by IPTG; 2, 4, 6, 8: Not induced by IPTG; 1: pET-glgC; 2: pET-295⁺³; 3: pET-336; 4: pET-295/336⁺¹; 5: pET-32a; 6: BSA; 7: 67 kDa bovine serum albumin, as a control.

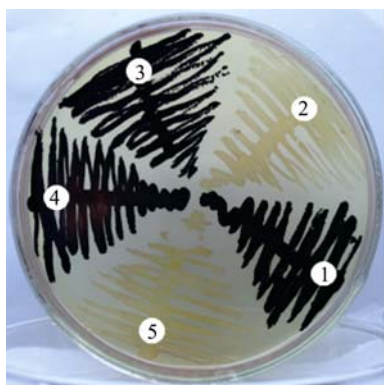


图 4 平板碘染法检测不同转化菌株产生的糖原

Fig. 4 Detection of biological activity by Iodine-Plate dyeing

1: pET-*glgC*; 2: pET-*glg295*⁺³; 3: pET-*glg336*; 4: pET-*glg295/336*⁺¹; 5: pET-32a.

EP 管碘染法可以方便快捷的检测宿主菌的糖原含量, 图 5 表明等细胞浓度的转化菌株合成糖原能力的大小排列是: 4 \cong 3 \cong 1 $>$ 2 \cong 5。

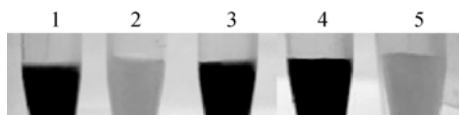


图 5 EP 管碘染法检测生物学活性

1: pET-*glgC*; 2: pET-295⁺³; 3: pET-336; 4: pET-295/336⁺¹; 5: pET-32a, 作为负对照。

Fig. 5 Detection of biological activity by EP iodine dyeing

1: pET-*glgC*; 2: pET-295⁺³; 3: pET-336; 4: pET-295/336⁺¹; 5: pET-32a, as a negative control.

2.5 糖原含量测定与分析

野生型及突变基因的转化子在 24 h 之内糖原含量的高低见图 6。结果表明, 按照糖原含量从高到低将细胞分为 3 类: *glg336* 和 *glg295/336*⁺¹ 较高, WT(野生型)的次之, *glg295*⁺³ 和 NC(空载体)较低。 *glg336* 的糖原含量在细胞培养的 24 h 之内均较其他样品高, 随着时间增长, 细菌达到稳定期后则糖原含量提高的幅度更大, *glg295/336*⁺¹ 的情况与 *glg336* 类似。 *glg295*⁺³ 在 0.5~10 h 之内比 NC 中的糖原含量稍高, 稳定期后, 两者糖原含量相近。

3 讨论

参照 GenBank 中的序列, 从 *Escherichia coli* JM109 中克隆到 *glgC* 基因的 1 296 bp 的全长序列。根据前人报道, 第 295 和 336 位氨基酸的单点突变都可以降低 AGPase 酶的反馈抑制效应, 从而使

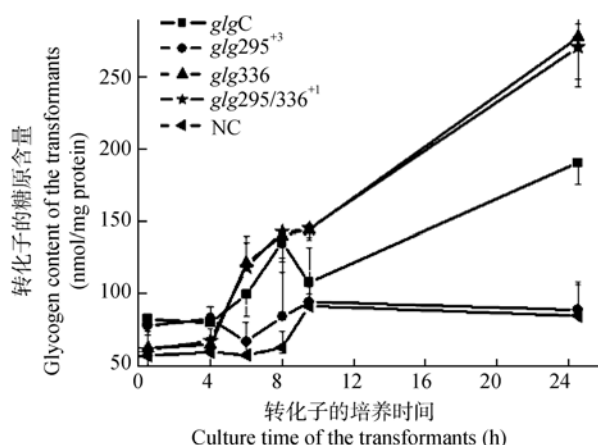


图 6 不同转化菌株产生的糖原量

Fig. 6 Analysis and determination of glyco-gen content

AGPase 酶活性提高。由此, 我们设计了特异引物, 通过 PCR 重组获得了 3 个突变基因: *glg295*⁺³、*glg336* 和 *glg295/336*⁺¹; 并构建了正确的融和表达载体, 进行蛋白质的诱导表达。结果表明, 在适合的诱导条件下, 目的基因得到特异表达, 大小与已有报道的大肠杆菌 AGPase 酶的大小一致, 约为 54 kDa。

通过碘染和培养期的糖原含量测定分析目的基因在宿主菌中的活性情况, 结果表明 pET-32a 空载体和突变体 *glg295*⁺³ 的糖原合成能力均较低。前者是由于大肠杆菌 BL21 中 *glgC* 基因的本底表达水平低, 造成 AGPase 酶的缺乏或者活力很低。后者是由于基因突变后造成的 AGPase 酶的活力降低, 直接原因是酶的反馈抑制效应增强。前人研究^[12]表明, P295S 的单点突变理应降低该酶的反馈抑制效应, 从而使细菌合成更大量的糖原, 实际的结果是 *glg295*⁺³ 的糖原含量较低, 通过对另 3 个突变位点 (V121A、M151I、V334 D) 的分析, 我们推测第 344 位的氨基酸突变可能造成了 AGPase 酶的反馈抑制效应的提高。还有另一种可能: P295S 的突变并不能真正引起 GlgC 酶反馈抑制效应的降低, 抑或是降低幅度低不能在文中的方法中检测到, 有待进一步研究证实。

突变基因 *glg336* 总体上使宿主细胞表现出较强的糖原合成能力。一方面是由于 *glg336* 基因表达的 AGPase 蛋白表现出的更低的反馈抑制效应, 间接的增强了酶活力, 这与已报道的结果一致^[7, 8]。 *glg295/336*⁺¹ 与 *glg336* 转化细胞的糖原含量相当接近, 而且 *glg295/336*⁺¹ 的意外突变 K109R 并没有引起氨基酸极性的变化, 而且第 109 位氨基酸不是原核细菌 GlgC 酶的功能位点, 由此表明 P295S 的突变

并没有造成 *glg336* 突变体中糖原含量的提高。

前人在进行 AGPase 酶活性检测时, 常用 *glgC* 缺陷型细菌 AC70R1-504 作为宿主细胞, 目的是为了消除普通大肠杆菌自身 *glgC* 基因的背景, 然而, 近期有人证明了该缺陷型细菌其实也具有糖原合成能力, 只要细胞中存在 ADP-Glc 底物^[24]。我们的实验结果证实 BL21 (DE3) 既可以作为基因表达的宿主菌, 也可以作为有效的功能检测菌, 为检测基因突变体的活性降低了难度和缩短了实验时间。

参考文献(References):

- [1] Press J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, 33(1): 431–454. [\[DOI\]](#)
- [2] Sweetlovel J, Muller-Roeber B, Willmizer L, Hill SA. The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta*, 1999, 209(3): 330–337. [\[DOI\]](#)
- [3] Okita TW, Nakata PA, Anderson JM, Sowokinos J, Preiss J. The subunit structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol*, 1990, 93(2): 785–790.
- [4] Tiessen A, Hendriks JH, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Eva M, Farré, Geigenberger P. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-transcriptional redox modification of ADPglucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell*, 2002, 14(9): 2191–2213. [\[DOI\]](#)
- [5] Morell MK, Bloom M, Knowles V, Preiss J. Subunit structure of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol*, 1987, 85(1): 182–187.
- [6] Baecker PA, Furlong CE, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glg C* gene. *J of Biol Chem*, 1983, 258(8): 5084–5088.
- [7] Cattaneo J, Oamotte M, Sigal N, Sanchez-Medina F. Genetic studies of *E.coli* K12 mutants with alterations in glycogenesis and properties of an altered adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969, 34(1): 694–701. [\[DOI\]](#)
- [8] Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science*, 1992, 258(5080): 287–292. [\[DOI\]](#)
- [9] Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, Lanning SP, Blake NK, Talbert LE, Giroux MJ. Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1724–1729. [\[DOI\]](#)
- [10] Gitzendanner J, Barry G, Cobb BG, Greene T, Okita T, Hannah LC. A single gene mutation that increases maize seed weight. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 5824–5829. [\[DOI\]](#)
- [11] Ihemere, U, Arias-Garzon D, Lawrence S, Sayre RT. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(4): 453–465. [\[DOI\]](#)
- [12] Meyer CR, Christopher R, Bork JA, Nadler S, Yirsa J, Preiss J. Site-directed mutagenesis of a regulatory site of *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase: The role of residue 336 in allosteric behavior. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 353(1): 152–159. [\[DOI\]](#)
- [13] Meyer CR, Ghosh P, Remy E, Preiss J. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a mutant *glgC* gene from *Escherichia coli* B. *J Bacteriol*, 1992, 174(13): 4509–4512.
- [14] Meyer CR, Yirsa J, Gott B, Preiss J. A kinetic study of site-directed mutants of *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase: The role of residue 295 in allosteric regulation. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 352(2): 247–254. [\[DOI\]](#)
- [15] Govons S, Vinopal R, Ingraham J, Preiss J. Isolation of mutants of *Escherichia coli* B altered in their ability to synthesize glycogen. *J Bacteriol*, 1969, 97(2): 970–972. [\[DOI\]](#)
- [16] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD. (Translated by MA Xue-Jun, SHU Yue-Long). Short Protocols in Molecular Biology (The fourth version). Beijing: Science Press, 2005, 54–55.
(美)F.M. 奥斯伯(Ausubel, F.M.)等主编, (马学军, 舒跃龙译). 精编分子生物学实验指南(第四版). 北京: 科学出版社, 2005, 54–55.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [18] JIA Xiao-Ying, ZHANG Jin-Wen, WANG Di. Site-directed mutagenesis of *glgC* gene of *Escherichia coli* BL21. *J Agri Biotechnol*, 2005, 13(5): 684–685.
贾笑英, 张金文, 王蒂. *Escherichia coli* 基因 *glgC* 的定点突变. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 684–685.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248–254.
- [20] Kavakli HI, Park JS, Slattey CJ, Salamone PR, Frohlick J, Okita TW. Analysis of allosteric effector binding sites of potato ADP-glucose pyrophosphorylase through reverse genetics. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 40834–40840. [\[DOI\]](#)
- [21] NING Zheng-Xiang. Determination of Glucose. Manual Analysis of Food Ingredients. Beijing: China Light Industry Press, 1983, 14–15.
宁正祥. 葡萄糖的测定. 见: 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1983, 14–15.
- [22] Hamada T, Kim SH, Shimada T. Starch-branching enzyme I gene (*IbSBEI*) from sweet potato (*Ipomoea batatas*): Molecular cloning and expression analysis. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(16): 1255–1261. [\[DOI\]](#)
- [23] Lee YM, Kumer A, Preiss J. Amino acid sequence of an *E. coli* ADP glucose synthetase allosteric mutants as deduced from the DNA sequence of the *glgC* gene. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(24): 10603–10603. [\[DOI\]](#)
- [24] Eydallin G, Morán-Zorzano M, Muñoz F, Baroja-Fernández E, Montero M, Alonso-Casajús N, Viale A, Pozueta-Romero J. An *Escherichia coli* mutant producing a truncated inactive form of *glgC* synthesizes glycogen: Further evidences for the occurrence of various important

sources of ADPglucose in enterobacteria. *FEBS Lett*, 2007, 581(23): 4417–4422.[\[DOI\]](#)